



저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사 학위논문

저선량 X 선 피폭 시 과민감성
현상에 대한 방사선 선량률의
영향성 연구

**The effect of X-ray dose rates on low-dose
HRS phenomenon with cells *in vitro***

2017년 2월

서울대학교 대학원

에너지시스템공학부

김 건 민

저선량 X 선 피폭 시 과민감성 현상에 대한 방사선 선량률의 영향성 연구

지도교수 김 은 희

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함
2017년 2월

서울대학교 대학원
에너지시스템공학부
김 건 민

김건민의 석사 학위논문을 인준함
2017년 2월

위 원 장 김 곤 호 (인)

부위원장 김 은 희 (인)

위 원 황 일 순 (인)

초록

저선량 방사선의 위해성에 대해서는 아직까지 명확한 결론이 나지 않아 현재까지도 연구 중에 있다. 저선량 방사선 연구의 일환으로 HRS(Hyper-radiosensitivity) 현상에 대해 활발히 연구가 진행되고 있다. HRS 현상이란 세포 군집형성능 실험을 진행하였을 때 저선량 방사선에 대한 생존율이 기존의 linear-quadratic 모델로 예상한 것보다 더 낮게 나타나는 현상을 의미한다. HRS 현상의 메커니즘에 대해 많은 연구가 진행되었지만 선량률과의 관계성에 대해서는 일관성 있는 결론이 지어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 선량률이 HRS 현상에 끼치는 영향성에 대해 in vitro 실험을 진행하였다.

0.5 Gy/min의 선량률로 정상세포인 rat diencephalon과 종양세포인 rat gliosarcoma를 피폭 시킨 후 세포 군집형성능 실험을 진행 한 결과 두 세포에서 모두 HRS 현상이 확인되었다. 선량률을 0.125와 1.5 Gy/min로 변경하여 동일한 실험을 진행한 결과, 두 세포 모두 0.125 Gy/min의 선량률에서는 HRS 현상이 나타났으나 1.5 Gy/min의 선량률에서는 그렇지 않았다. 선량률에 따른 회복 기작의 차이가 위와 같은 결과를 일으킨 것이라 보고 2단계 조사 실험을 진행하였다. 1.5 Gy/min의 선량률로 0.2 Gy만큼 선행 조사한 후, 0.125와 0.5 Gy/min의 선량률로 피폭 시킨 결과 두 세포 모두 HRS 현상이 없어짐을 확인하였다. 이를 통하여 고선량률의 방사선에 의해서는 저선량 피폭 시에도 세포 내 회복 기작을 일으키는 것이라고 판단하였다. 마지막으로 선량률에 따른 apoptosis의 유발 정도를 flow-cytometry법으로 확인해봤다. 두 세포 모두 저선량의 방사선 영역에서 HRS 현상이 일어나는 조건의 저선량률로 피폭 시 고선량률 피폭 시보다 더 많은 apoptosis가 유발되는 것을 확인하였다. 이 결과를 통해 고선량률 저선량 피폭 시에는 회복 기작이 충분히 일어나 apoptosis가 일어나지 않은 것이라 해석하였다.

본 연구에서는 선행연구에서 제시한 결론과는 달리 높은 선량률로 세포

를 피폭시킬 경우 HRS 현상이 나타나지 않는 것을 확인했다. 또한 HRS 현상이 일어나는 주요 원인이 apoptosis임을 확인하였고 이를 통해 저선량 방사선 피폭의 위해성을 과대평가할 여지가 없다고 판단하였다. 마지막으로 암 치료를 위한 방사선 분할 조사 치료 시, HRS 현상을 방지할 수 있는 선량률을 선택함으로써 정상세포를 불필요한 세포사멸로부터 지켜야한다고 제언하는 바이다.

주요어 : HRS 현상, 방사선 선량률, 저선량 방사선, 세포 자살, 방사선 방호

학 번 : 2015-21309

목 차

제 1 장 서론	1
1.1 연구의 목적	1
1.2 연구 범위	2
제 2 장 배경이론	4
2.1 방사선의 생물학적 영향성	4
2.2 세포 군집형성능 실험(Clonogenic assay)	6
2.3 Linear-Quadratic 모델(LQ model)	7
2.4 저선량 과민감성(Low dose hyper-radiosensitivity, HRS), Induced-repair 모델(IR model)	8
2.5 세포자살(Apoptosis)	11
제 3 장 대상 및 방법	13
3.1 세포와 배양 방법	13
3.2 방사선 조사	13
3.3 세포 군집형성능 실험(Clonogenic assay)	14
3.4 세포자살 분석(Apoptosis analysis)	17
3.5 통계 분석	17
제 4 장 실험 결과 및 분석	18
4.1 Rat diencephalon cell과 rat gliosarcoma cell 에서의 HRS 현상	18
4.2 방사선 선량률에 따른 HRS 현상의 변화	25

4.3 2단계 조사(2-step irradiation) 실험	31
4.4 Apoptosis 분석 결과	33
4.5 논의	36
4.5.1 선행연구와의 차이점 분석	36
4.5.2 방사선 방호의 관점에서 본 연구가 가지는 의의	39
4.5.3 방사선 치료의 관점에서 본 연구가 가지는 의의	40
 제 5 장 결론	 42
 참고문헌	 44
Abstract	47

표 목 차

Table. 3. 3 X-ray irradiation conditions in case of conventional clonogenic assay	16
Table. 3. 3 X-ray irradiation conditions in case of two-step irradiation clonogenic assay	16
Table. 4. 1. 1 Parameters obtained from linear-quadratic model fitting with clonogenic survival curves after 0.5 Gy/min dose rate x-ray irradiation. The values in parentheses indicate standard error of each parameters.	22
Table. 4. 1. 2 Parameters obtained from induced-repair model fitting with clonogenic survival curves after 0.5 Gy/min dose rate x-ray irradiation. The values in parentheses indicate standard error of each parameters.	22
Table. 4. 2. 1 Parameters obtained from linear-quadratic model fitting with clonogenic survival curves after various dose rate x-ray irradiation. The values in parentheses indicate standard error of each parameters.	28
Table. 4. 2. 2 Parameters obtained from induced-repair model fitting with clonogenic survival curves after various dose rate x-ray irradiation. The values in parentheses indicate standard error of each parameters.	28

그림 목차

Fig. 2. 4 Example of cell survival curve with evidence of hyper-radiosensitivity(HRS). Dashed line shows extrapolation from linear-quadratic model(LQ model) applied to whole dose range data. Solid line shows fitting result with induced-repair model(IR model). The meanings of each coefficient in Eqn. 4 are shown in the graph.	10
Fig. 2. 5 Clonogenic cell survival curves in rat diencephalon(a) and rat gliosarcoma(b) after 0.5 Gy/min dose rate x ray irradiation. The error bars mean standard error of each data point. Small graphs in each graph are expanded one ranging 0 to 1 Gy.	12
Fig. 4. 1. 1 Clonogenic cell survival curves in rat diencephalon(a) and rat gliosarcoma(b) after 0.5 Gy/min dose rate x ray irradiation. The error bars mean standard error of each data point. Small graphs in each graph are expanded one ranging 0 to 1 Gy.	20
Fig. 4. 1. 2 Fitting results of clonogenic cell survival curves in rat diencephalon(a) and rat gliosarcoma(b) after 0.5 Gy/min dose rate x ray irradiation. Solid lines indicate the fitting results with LQ model and dashed lines for IR model.	21
Fig. 4. 1. 3 Plotting results of $-(\ln(SF))/D$ as a function of D for rat diencephalon(a) and rat gliosarcoma(b) from survival fraction after 0.5 Gy/min dose rate X-ray irradiation. The error	

bars mean standard error of each data point. The solid lines represent the linear fitting results extrapolated with high dose range data. 23

Fig. 4. 2. 1 Clonogenic cell survival curves in rat diencephalon(a, b) and rat gliosarcoma(c, d) after various dose rates x ray irradiation. The error bars mean standard error of each data point. (c) and (d) are the expanded graphs ranging 0 to 1 Gy. 26

Fig. 4. 2. 2 Fitting results of clonogenic cell survival curves in rat diencephalon(a, c) and rat gliosarcoma(b, d) after 0.125 or 1.5 Gy/min dose rate x ray irradiation. Solid lines indicate the fitting results with LQ model and dashed lines for IR model. 27

Fig. 4. 2. 3 Plotting results of $-(\ln(SF))/D$ as a function of D for rat diencephalon(a) and rat gliosarcoma(b) from survival fraction after various dose rates X-ray irradiation. The error bars mean standard error of each data point. The solid lines represent the linear fitting of data with 1.5 Gy/min dose rate. 29

Fig. 4. 3 Clonogenic survival curve of cells irradiated with single doses of various dose rates of X-ray or irradiated with a 0.2 Gy priming dose of 1.5 Gy/min dose rate before the challenge doses shown on the dose axis were given with 0.125 or 0.5 Gy/min dose rates. (a) and (b) for rat diencephalon and (c) and (d) for rat gliosarcoma. The error bars mean standard

error of each data point.	31
Fig. 4. 4 Normalized value of induced apoptotic death in rat diencephalon(a) and rat gliosarcoma(b) after X-ray irradiation with various dose rates. The error bars mean standard error of each data point.	34

제 1 장 서론

1.1 연구의 목적

세포 군집형성능 실험(Clonogenic assay)은 방사선에 대한 민감성을 평가할 목적으로 오랜 기간 동안 여러 포유류 세포재를 대상으로 진행해왔다. Puck과 Marcus가 세포 군집형성능 실험을 체계적으로 확립했고 이 실험을 통해 세포들의 방사선 민감성을 쉽게 측정할 수 있게 되었다. [1] 하지만 Puck과 Marcus의 실험법은 세포 계수와 plating 과정에서 오차가 많이 발생했고 이 결과 저선량의 방사성 영역에 대한 정확한 실험 결과를 제시하지 못했다. 그러나 과학 기술이 발전함에 따라 세포 계수 시스템도 발전하였는데, 그 중 Durand가 제시한 유동세포계수법은 세포 계수의 정확성을 높여줬고 이를 통해 세포를 페트리 디쉬에 plating하는 과정에서 발생하는 오차가 현저히 줄어들었다. [2] 이 때문에 저선량 영역에서의 데이터를 안정적으로 획득할 수 있었고 세포들이 저선량 영역(<0.5Gy)에서 LQ 모델로 예상한 것보다 더 낮은 생존 확률을 나타냄을 확인할 수 있었다. Marples와 Joiner가 Chinese hamster V79 cells를 이용하여 이와 같은 현상을 처음으로 제시했고 이를 Low-dose Hyper-radio sensitivity(HRS) 현상이라고 명명하였다. [3] HRS 현상은 인간의 정상세포와 암세포를 비롯하여 mouse, rat의 경우에서도 확인됐다. 0.5 Gy 미만의 방사선은 세포 내 회복기작에 관여하는 단백질인 Ataxia Telangiectasia-Mutated(ATM) 기반의 G2 phase cell cycle arrest를 일으키지 못하는 것으로 알려졌다. [4] 이에 따른 회복기작의 부재로 완전히 회복되지 못한 세포들이 세포자살(apoptosis)로 인해 죽게

되고 이로 인해 생존율이 떨어져 HRS 현상이 일어난다고 밝혀졌다. [5] HRS 현상의 메커니즘을 확인하기 위해 다양한 방법으로 연구가 진행 중이지만 그 중에서도 선량률과의 영향성은 아직까지 명확하게 규명되고 있지 않다. Marples et al.은 HRS 현상이 선량률과 상관없이 항상 같은 범위의 선량 영역 하에 일어났다고 주장한 반면, Thomas et al.은 선량률과 상관없이 HRS 현상이 일어나는 것은 Marples의 실험결과와 동일하지만, HRS 현상이 일어나는 선량 영역이 선량률에 따라 다르다고 주장하였다. [3, 6] 이와 같이 선량률과 HRS 현상 간의 관계성이 확증되지 않았기 때문에 본 연구에서 방사선 선량률이 HRS 현상에 끼치는 영향에 대해 확인해보았다. 본 연구에서는 Rat diencephalon과 rat gliosarcoma cell line을 이용하여 HRS 현상을 관찰하고 HRS현상과 선량률과의 관계를 규명해보고자 한다.

1.2 연구 범위

방사선의 영향성을 판단하기 위한 연구로는 역학조사, in vivo 실험, in vitro 실험이 있다. 그 중 in vitro 실험은 세포 배양을 통하여 세포의 생존율을 관찰하거나 세포 내에서 특정 단백질의 발현을 확인하는 방식 등으로 진행된다. 생명체에 대한(특히 인간) 방사선의 영향성을 직접적으로 실험하는 것은 불가능하기 때문에 in vitro 방식으로 방사선에 대한 영향성을 확인하는 경우가 많다. 본 연구에서도 저선량의 방사선에 대한 이해도를 제공하기 위해 in vitro의 방식으로 실험을 진행하였다.

본 연구에서는 정상세포인 rat diencephalon과 종양세포인 rat gliosarcoma에서 HRS현상의 유무를 확인하였다. 우선 정상세포와 종양세포 사이에서 일어나는 HRS현상을 세포군집형성능 실험(Clonogenic

assay)을 통하여 알아보았다. 이후에 선량률의 변화가 HRS현상에 어떤 영향을 끼치는지 같은 실험을 통해 확인했다. 나아가 특정 조건의 선량률로 선행 조사(Priming irradiation)한 후 같은 실험을 진행했을 경우 세포의 생존율이 어떻게 변하는지 확인하였다. 마지막으로 flow-cytometry를 이용하여 각 선량률 조건에서 세포자살(apoptosis)이 어느 정도의 비율로 일어나는지 확인하였다. 모든 방사선 조사는 X-선 발생기를 통해 진행되었다. 본 연구 결과를 통해 저선량의 방사선에 대한 영향성에 대해 파악하였다. 나아가 연구 결과를 방사선 방호와 의료학적 관점으로 분석하여 앞으로 진행될 저선량 방사선 연구에 대한 방향성을 제시하였다.

제 2장 배경이론

2.1 방사선의 생물학적 영향성

전리 방사선(Ionizing radiation, 이하 방사선)은 세포 내에서 물리적, 화학적 작용을 통해 세포의 손상을 입히고 심한 경우 세포 죽음(cell death)에 이르게 한다. 방사선이 세포 내에서 일으킬 수 있는 사건의 경우는 다음과 같다. [7]

- 1) 방사선이 세포 내부를 통과하지만 아무런 에너지 전달을 하지 못한다.
- 2) 세포 내에서 에너지 전달을 통해 손상을 일으키지만 회복된다.
- 3) 세포 내에서 에너지 전달을 통해 세포의 분화 능력을 감퇴시킨다.
- 4) 세포 내에서 에너지 전달을 통해 직접 세포의 죽음을 일으킨다.

특히 방사선이 DNA에 에너지를 전달하게 되면 DNA Double Strands Breaks (DSBs)를 일으켜 세포의 유전 정보에 큰 타격을 입힌다. 이 때, DNA에 손상을 입히는 방법은 직접 작용 (Direct action)과 간접 작용 (Indirect action) 두 가지가 존재한다. 직접 작용을 통하여 방사선은 직접적으로 DNA의 사슬 가닥과 반응하여 손상을 입혀 세포의 건전성을 해친다. 간접 작용은 방사선이 세포 안에 물과 반응하여 활성산소종 (Reactive Oxygen species, ROS)을 생성하여 DNA의 손상을 간접적으로 일으키는 방식이다. 직접 작용은 High LET(Linear Energy Transfer)

방사선에 주로 일어나고 간접 작용은 low LET 방사선에 의해 잘 일어나는데, X-ray는 LET가 낮기 때문에 주로 간접 작용에 의한 세포 손상을 일으킨다.

2.2 세포 군집형성능 실험(Clonogenic assay)

세포 군집형성능 실험은 화학물질이나 방사선 등과 같이 해로운 영향을 끼칠 수 있는 요인에 대해서 세포의 생존율이나 증식능력을 확인하기 위해 설계된 실험이다. 방사선은 DSB를 통해 세포 내 유전물질에 직접적으로 영향을 끼치거나 활성산소를 발생시킴으로써 간접적으로 영향을 주어 종단에는 세포의 죽음으로 이르게 한다. 세포 군집형성능 실험을 통하여 이러한 방사선에 의한 영향성을 확인할 수 있다. 직접적으로는 선량에 따른 세포의 증식능력을 평가할 수 있다. 세포의 생존율은 방사선 조사를 하지 않은 세포 대비 방사선 조사가 이루어진 세포의 군집(colony)의 수를 측정함으로써 확인할 수 있다. 생존율을 구하는 공식은 다음과 같다.

$$Surviving Fraction = \frac{Number\ of\ Colonies / Number\ of\ cells\ seeded}{Plating\ Efficiency} \times 100(\%)$$

(1)

여기서 세포를 seeding 했다고 해서 모든 세포가 군집을 형성하는 것이 아니기 때문에 Plating efficiency(PE)라는 값을 이용해 보정해준다. PE는 어떤 처리도 하지 않은 세포를 seeding하였을 때 seeding된 세포의 수 대비 colony 수를 의미한다. (식. 2)

$$PE = \frac{Number\ of\ Colonies}{Number\ of\ cells\ seeded} \quad (2)$$

2.3 Linear-Quadratic 모델 (LQ model)

Linear-Quadratic 모델(이하 LQ 모델)은 Lea의 표적설(Target theory)에 근거로 하여 방사선에 대한 세포의 생존율을 추정하는 것이다. [7] Lea의 표적설에 따르면 방사선에 의한 DSB(Double strand break)나 두 개의 독립적이면서 DSB로 발전할 수 있는 SSB(Single strand break)이 세포 사멸을 야기한다고 알려져 있다. LQ모델은 이 가정을 수식화한 것으로 아래와 같이 표현할 수 있다.

$$SF = \exp[-(\alpha d + \beta d^2)] \quad (3)$$

Where

S : Survival fraction

α, β : Cell susceptibility to sub-lethal and lethal damage.

d : Dose of radiation

위 식에서 α 는 저선량 영역에서 생존곡선의 기울기로 해석이 되며, β 는 고선량 영역에서 우세한 값을 가져 고선량에서의 곡선의 모양을 결정한다. α, β 값은 세포재에 따라 다르며 같은 세포재더라도 선량률이나 방사선의 에너지, 종류에 따라 다른 값을 가질 수 있다.

2.4 저선량 과민감성 (Low dose hyper-radiosensitivity, HRS), Induced-repair 모델(IR model)

저선량 과민감성 현상(이하 HRS)은 약 0.5 Gy 이하의 저선량 영역에서 LQ 모델로 예상한 세포 생존율보다 낮은 생존율을 나타내는 현상을 의미한다. (Fig. 2. 4) 선량을 약 0.5 이상으로 조사하게 되면 다시 생존율이 LQ 모델의 수준으로 회복되는데 이 구간을 Increased Radio-resistance (IRR)이라고 한다. 보통 HRS 현상이 일어나는 cell line의 경우 IRR도 함께 일어난다. HRS 현상은 지금까지 인간, mouse, rat을 비롯한 포유류 동물의 세포에서 확인됐다. 현재까지 HRS 현상이 일어나지 않는 cell line에는 SiHa cell (human cervical squamous carcinoma), U373 (human glioblastoma) 3.7 (rat fibroblast cell)등이 있다. [8, 9] HRS현상이 일어나는 원인은 앞서 서론에서 밝힌 바와 같이 저선량 방사선에 의한 회복기작의 부재로 인해 나타난다. HRS 현상은 X-ray 뿐만 아니라 파인-메손, 양성자, 중성자 그리고 알파선에 의해서도 나타나는 것으로 확인됐다. [10-13] 그러나 고 LET 방사선의 피폭 시에는 IRR 구간이 잘 확인되지 않는 것이 확인됐다.

HRS 현상이 발견됨에 따라 LQ 모델이 저선량 영역에서 세포 생존율을 잘 표현하지 못한다는 한계점이 발생되었다. 이에 따라 고선량 영역에서 뿐만 아니라 저선량 영역에서의 HRS 현상을 잘 표현할 수 있는 생존곡선 모델이 필요하게 되었다. 이러한 이유로 도입된 모델이 Induced- Repair 모델(이하 IR 모델)이다. (식. 4) [14]

$$SF = \exp[-(\alpha_r(1 + (\frac{\alpha_s}{\alpha_r} - 1)\exp(-d/d_c))d + \beta d^2)] \quad (4)$$

Where

S : Survival fraction

α_r : Value of α that of the conventional high-dose response

α_s : Value of α describing the HRS region

d_c : The transition point indicating the change from HRS to IRR

β : The constant as in the LQ model

d : Dose of radiation

세포 생존율 데이터를 위 식으로 fitting함으로써 HRS현상이 일어났는지 여부를 확인할 수 있다.

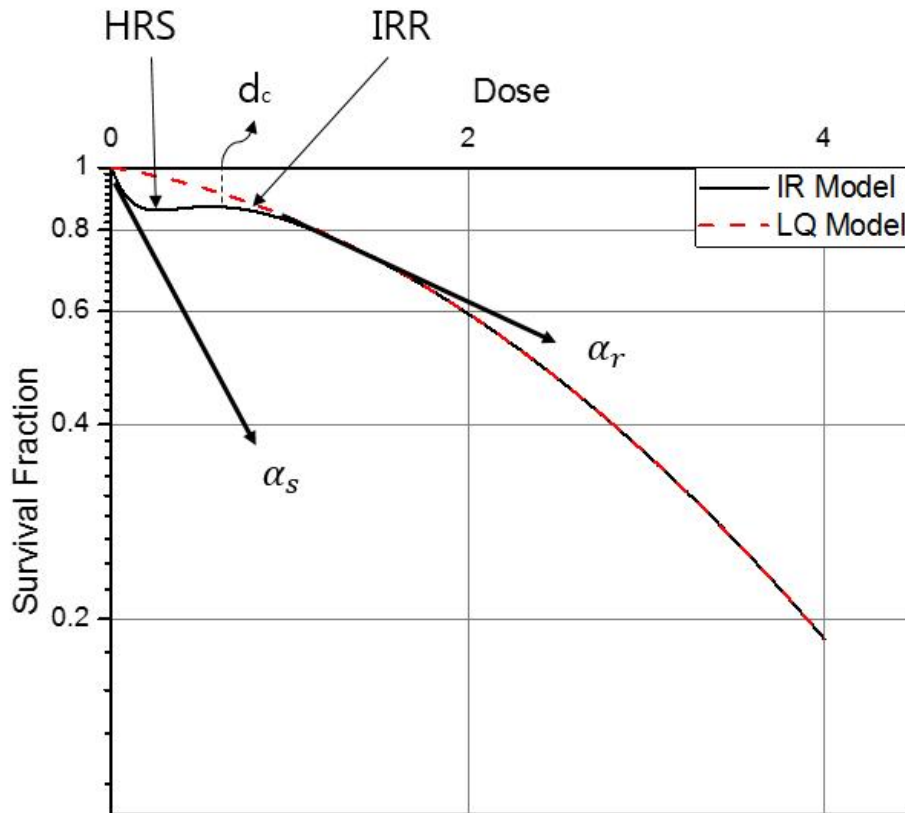


Fig. 2. 4 Example of cell survival curve with evidence of hyper-radiosensitivity(HRS). Dashed line shows extrapolation from linear-quadratic model(LQ model) applied to whole dose range data. Solid line shows fitting result with induced-repair model(IR model). The meanings of each coefficient in Eqn. 4 are shown in the graph.

2.5 세포자살(Apoptosis)

세포자살은 계획된 세포 죽음(programmed cell death)으로 더 이상 필요하지 않은 세포나 노화되거나 피해가 축적된 세포들 사이에서 일어난다. 세포자살은 크게 두 단계로 나뉘지는데, 우선 세포 표면에 Phosphatidylserine가 나타나 세포자살 신호를 보낸다. 이후에 식세포에 의해 제거되는 단계에 의해 세포자살이 완료된다. 세포자살 과정에서 세포질이 응축되며, 응축된 세포가 여러 조각으로 나뉘게 된다. 이렇게 나뉜 세포 조각을 식세포가 제거함으로써 세포자살이 일어난다. 외부의 강한 자극으로 인해 발생하는 세포괴사(necrosis)와는 달리 세포자살은 유전적으로 계획되었으며, 개체의 건전성을 지킴으로써 이익을 제공하기 위해 일어난다. [15] (Fig. 2. 5)

세포자살이 암유발 억제 단백질인 p53에 의해 조절된다는 것이 밝혀졌다. DNA 손상이 일어날 경우 p53 단백질이 발현되고 p53은 세포를 G1 주기에 정지시킴으로써 손상된 세포의 복제를 막는다. 세포가 G1 주기에 있는 동안 DNA를 회복할 수 있는 시간을 확보하게 된다. 그러나 피해가 회복 불가능할 정도라면 세포자살 기작이 발현된다. 따라서 세포자살을 통해 발암 가능성이 있는 세포를 제거할 수 있고 이를 통해 주변의 정상세포를 종양화로부터 지킬 수 있다. [16]

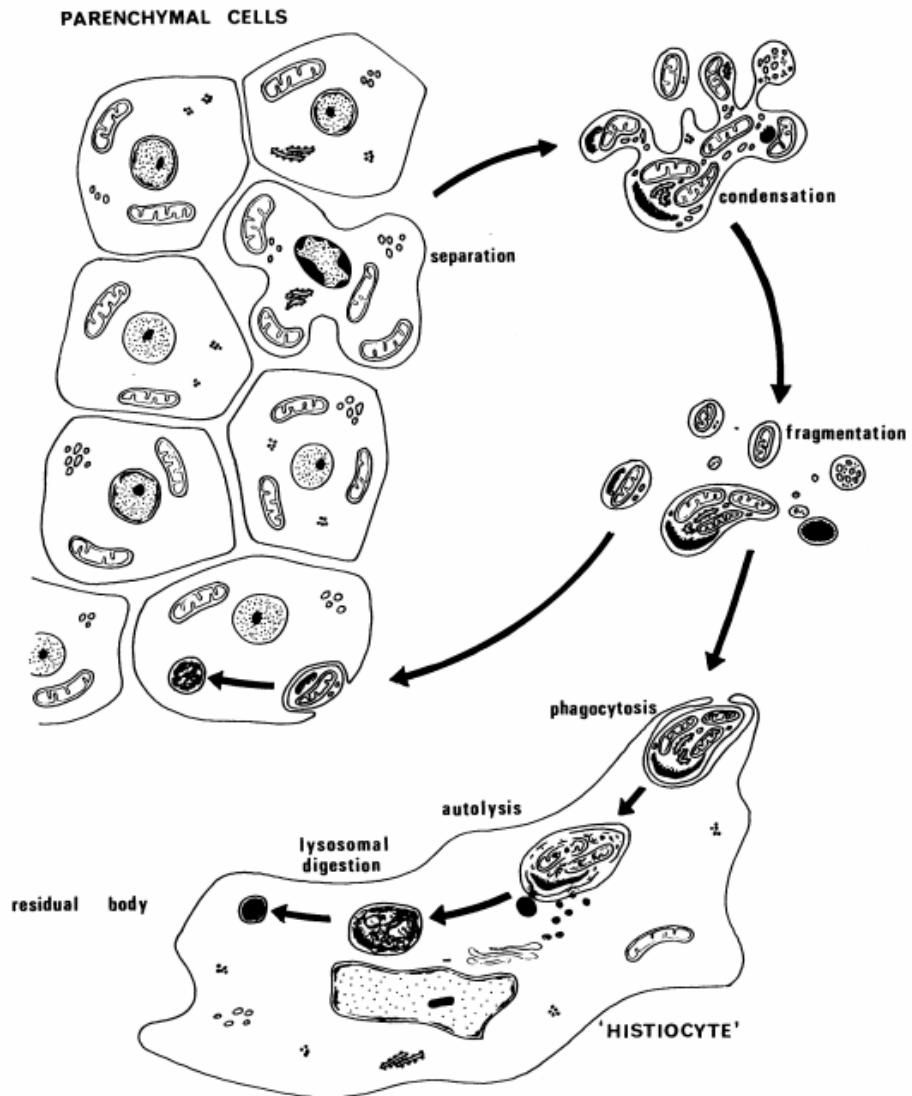


Fig. 2. 5 Diagram illustrating the morphological features of apoptosis.

제 3장 대상 및 방법

3.1 세포와 배양 방법

본 연구에서는 HRS 현상이 정상세포와 종양세포에서 차이를 가지고 나타나는지 확인해봤다. 정상세포로는 간뇌세포인 Rat diencephalon cells(DI TNC 1, CRL-2005, ATCC)를, 종양세포로는 신경교육종인 Rat gliosarcoma cells(9L/lacZ, CRL-2200, ATCC)를 사용하였다. 모든 세포는 25-T Flask(Falcon) 내에 90 % Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco)과 10% Fetal Bovine Serum (FBS, ATCC) 혼합액에서 배양하였다. 또한 37℃ 온도와 10%의 CO₂의 대기 조건으로 유지되는 incubator 내에서 배양이 이루어 졌다.

3.2 방사선 조사

모든 실험에 사용한 방사선 조사는 서울대학교 원자핵공학과 방사선생명공학연구실에 있는 YXLON MODEL 450-D08 X-ray generator를 통해 진행했다. 방사선 선량률은 X-ray generator의 전류값을 조정함으로써 변화시켰다. 실험에 사용 선량률은 0.125 Gy/min, 0.5 Gy/min 그리고 1.5 Gy/min이다. 이는 장치의 운전 전압을 150 kVp로 설정한 상태에서 전류값을 각각 1.25 mA, 5mA 그리고 1.5 mA로 설정함으로써 얻을 수 있는 선량률이였다.

3.3 세포 군집형성능 실험 (Clonogenic assay)

본 실험에서 세포 군집형성능 실험은 두 가지 방식으로 진행되었다. 첫 번째로 실험에서 사용한 두 세포 Rat diencephalon cell과 Rat gliosarcoma cell에서 HRS 현상이 나타나는지 확인하기 위한 방식의 실험과 두 번째로 특정 방사선 조건의 선행 조사(Priming irradiation)가 HRS 현상에 영향을 끼치는지 확인하기 위한 2단계 조사법을 이용한 방식의 실험이 있다.

첫 번째 방식의 실험에서는 25 T-Flask 내에서 배양된 세포들을 trypsinizing 하여 바닥 표면에서 떼어난 후에 33mm 6-well cell dish에 seeding하였다. 모든 조건에서 약 500개의 세포를 seeding하였다. 또한 세포 계수는 flow cytometry 기반으로 한 Muse® cell analyzer를 이용해 진행되었다. 세포를 seeding한 후 3 ml의 DMEM을 첨가한 후에 방사선 조사를 진행하였다.

두 번째 방식의 실험에서는 세포가 25 T-Flask 내에 있는 상태에서 1.5 Gy/min의 선량률로 0.2 Gy의 방사선을 조사한 후 6-well cell dish에 seeding하였다. Seeding 후 회복 기작이 충분히 작동하도록 6시간 동안 배양하였고, 배양 후에 다시 방사선 조사가 이루어졌다. 모든 방법이 동일하지만, seeding을 하기 전에 선행 조사가 이루어 졌다는 점이 다르다. 이는 1.5 Gy/min의 선량률로 0.2 Gy의 방사선 조사가 HRS 현상을 제거할 수 있는가를 확인하기 위해 진행하였다. 각각의 방식으로 실험할 때의 조사 조건은 Table. 3. 3과 3. 4에 정리하였다.

방사선 조사가 이루어진 후에는 3일 마다 한 번씩 영양공급을 위해 세포 배양액을 갈아주었다. 배양 9~10일 차가 되면 육안으로 세포 군집(colony)을 확인할 수 있다. 세포 군집을 확인하면 배지를 흡입하고

Phosphate Buffered Saline (PBS, Gibco)로 세척한 후에 70% 에탄올로 세포 고정(Fixation)을 한다. 세포 고정이 완료되면 다시 PBS로 세척한 후에 5% Giemsa (Sigma Aldrich)로 세포를 염색하고 세포 군집을 육안으로 계수한다.

Table. 3. 3 X-ray irradiation conditions in case of conventional clonogenic assay.

실험 세포	선량률	선량
-Rat Diencephalon	0.125 Gy/min	0.1 Gy
		0.2 Gy
		0.3 Gy
		0.4 Gy
	0.5 Gy/min	0.5 Gy
-Rat Gliosarcoma	1.5 Gy/min	0.75 Gy
		1 Gy
		1.5 Gy
		2 Gy
		4 Gy

Table. 3. 4 X-ray irradiation conditions in case of two-step irradiation clonogenic assay.

실험 조건	내용
대조군	-0.125 Gy/min or 0.5 Gy/min의 선량률로 단독 조사
실험군	-1.5 Gy/min의 선량률로 0.2 Gy만큼 선행 조사 후 6 시간 동안 배양 -배양 후 0.125 Gy/min or 0.5 Gy/min으로 한 번 더 조사

3.4 세포자살 분석 (Apoptosis analysis)

Muse® cell analyzer를 이용하여 방사선 조사 후 세포자살이 얼마나 일어나는지 분석하였다. 세포자살 과정 중에 세포자살 신호를 보내기 위해 세포 표면에 Phosphatidylserine(PS)가 나타난다. 이 PS에 친화성이 큰 Annexin V를 부착시킨 후 유동계수법(flow cytometry)를 이용해 PS가 부착된 세포의 백분율을 정량적으로 분석할 수 있다.

본 연구에서는 세포를 방사선에 피폭시킨 후 24시간 동안 배양한 후 Annexin V를 20분 동안 염색하였다. 이후 Muse® cell analyzer를 이용하여 세포고사가 발생해 염색된 세포의 백분율을 구했다.

3.5 통계 분석

그래프를 그리는 데 이용한 결과 값은 모두 평균값 \pm 표준 오차로 표시하였다. HRS 현상의 유무를 확인하기 위해 데이터들을 LQ모델과 IR 모델로 fitting하였으며, 더 나은 fitting 결과를 확인하기 위한 척도로 R-Square 값을 비교하였다. 모든 통계적 분석은 OriginLab 프로그램을 이용해 진행하였다.

제 4장 실험 결과 및 분석

4.1 Rat diencephalon cell과 rat gliosarcoma cell에서의 HRS 현상

Rat diencephalon cell과 rat gliosarcoma cell을 대상으로 0.5 Gy/min의 선량률로 세포 군집형성능 실험을 한 결과는 Fig. 4. 1. 1과 같다. 실험 결과 0.1에서 0.5 Gy 영역에서의 Surviving Fraction 값이 매우 낮게 나타나는 현상을 두 세포에서 확인했다. 위 영역에서 Surviving Fraction의 값이 1 Gy에서의 값과 비슷하였다.

HRS 현상이 일어났는지 여부를 정량적으로 확인하기 위해 LQ model과 IR model로 생존율 곡선을 fitting해봤다. (Fig. 4. 1. 2) IR model이 더 좋은 fitting 결과를 제시할 경우 HRS 현상이 일어났다고 판단하였다. 이 때, 어떤 모델이 더 좋은 fitting을 제공하는가의 척도로 R-square 값을 비교하였다. 각각의 모델에 대한 수식은 아래와 같다.

$$\text{LQ 모델} \quad : \quad SF = \exp[-(\alpha d + \beta d^2)] \quad (3)$$

$$\text{IR 모델} \quad : \quad SF = \exp[-(\alpha_r(1 + (\frac{\alpha_s}{\alpha_r} - 1)\exp(-d/d_c))d + \beta d^2)] \quad (4)$$

그 결과 두 세포 모두 IR model가 더 좋은 fitting을 제시하였음을 확인했다. 이를 통해 두 세포 모두 HRS 현상이 일어났다고 해석하였다. 각 fitting에 대한 결과는 Table. 4. 1. 1과 4. 1. 2에 정리하였다.

HRS 현상이 일어났는지 다른 방법으로 확인하기 위해 데이터의 값을 재처리해봤다. LQ 모델에 따르면 식 (3)을 변형하여 생존율 값을 이용해 방사선 선량에 따른 일차식을 만들 수 있다.

$$\begin{aligned} SF &= \exp[-(\alpha d + \beta d^2)] \\ -\ln(SF) &= \alpha d + \beta d^2 \\ -\ln(SF)/d &= \alpha + \beta d \quad (5) \end{aligned}$$

즉, 생존율 데이터가 LQ model을 따른다면 방사선 선량에 따른 $-\ln(SF)/d$ 값이 선형성을 띠는 것이다. 그러나 Fig. 4. 1. 3에서 볼 수 있듯이 두 세포 모두 약 0.75 Gy 이상의 영역에서는 선형성을 떠나 그보다 낮은 선량 영역에서는 그렇지 않은 양상을 보였다. 이러한 양상은 저선량 영역에서 생존율 값이 LQ 모델로 예측하였을 때보다 더 낮은 값을 갖기 때문에 $-\ln(SF)$ 값이 커져서 나타난 현상으로 해석하였다. 따라서 본 실험을 통해 얻은 데이터는 LQ 모델을 따르지 않았으며 HRS 현상이 일어났다고 판단하였다.

또한 Rat diencephalon과 rat gliosarcoma에서 큰 차이를 두고 일어나지 않았다. 더 나아가 두 세포는 다른 방사선 민감도를 보인다. (LD50 Rat diencephalon : 2.81 Gy vs Rat gliosarcoma : 4.12 Gy) Rat diencephalon이 Fig. 4. 1. 1에서도 볼 수 있듯이 방사선에 더 민감한 모습을 보인다. 위 결과를 통해서 방사선 민감성에 관계없이 HRS 현상이 일어났음을 확인하였다. 따라서 HRS 현상을 결정하는 것에 있어서 세포의 방사선 민감성이나 세포가 정상 세포인지 종양세포인지는 영향을 끼치지 않는다고 판단하였다.

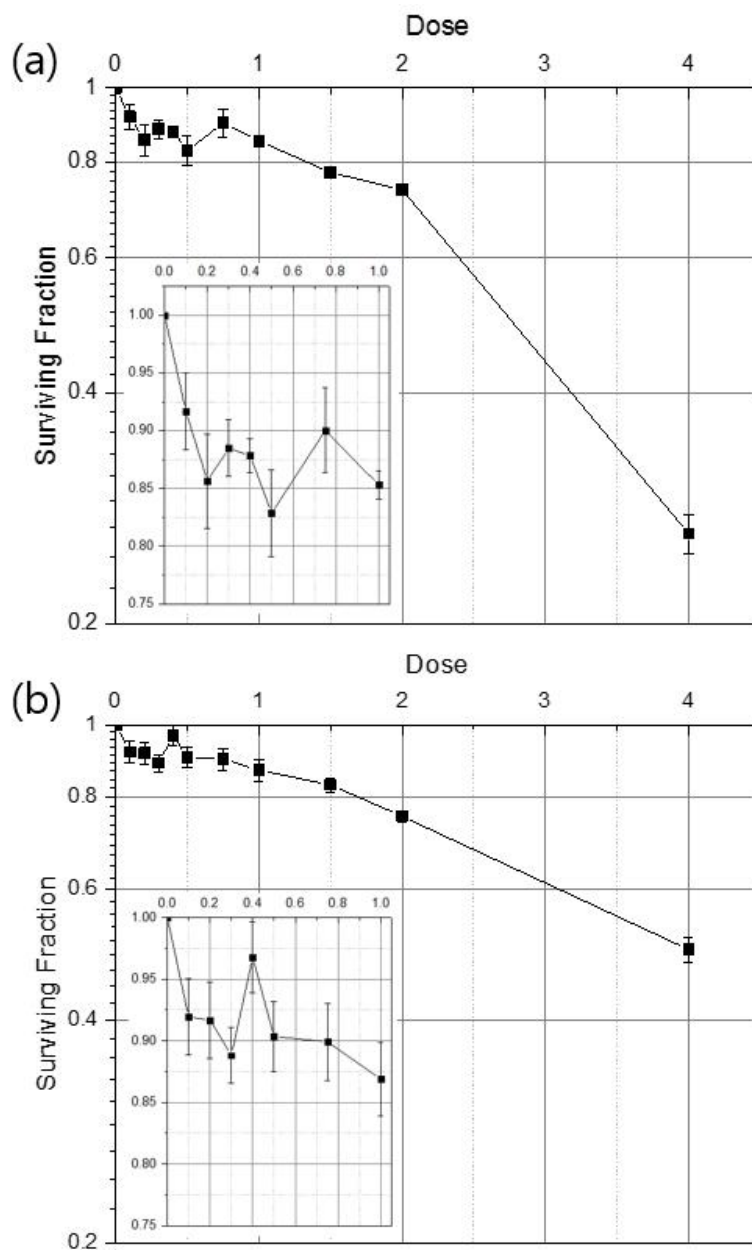


Fig. 4. 1. 1 Clonogenic cell survival curves in rat diencephalon(a) and rat gliosarcoma(b) after 0.5 Gy/min dose rate x ray irradiation. The error bars mean standard error of each data point. Small graphs in each graph are expanded one ranging 0 to 1 Gy.

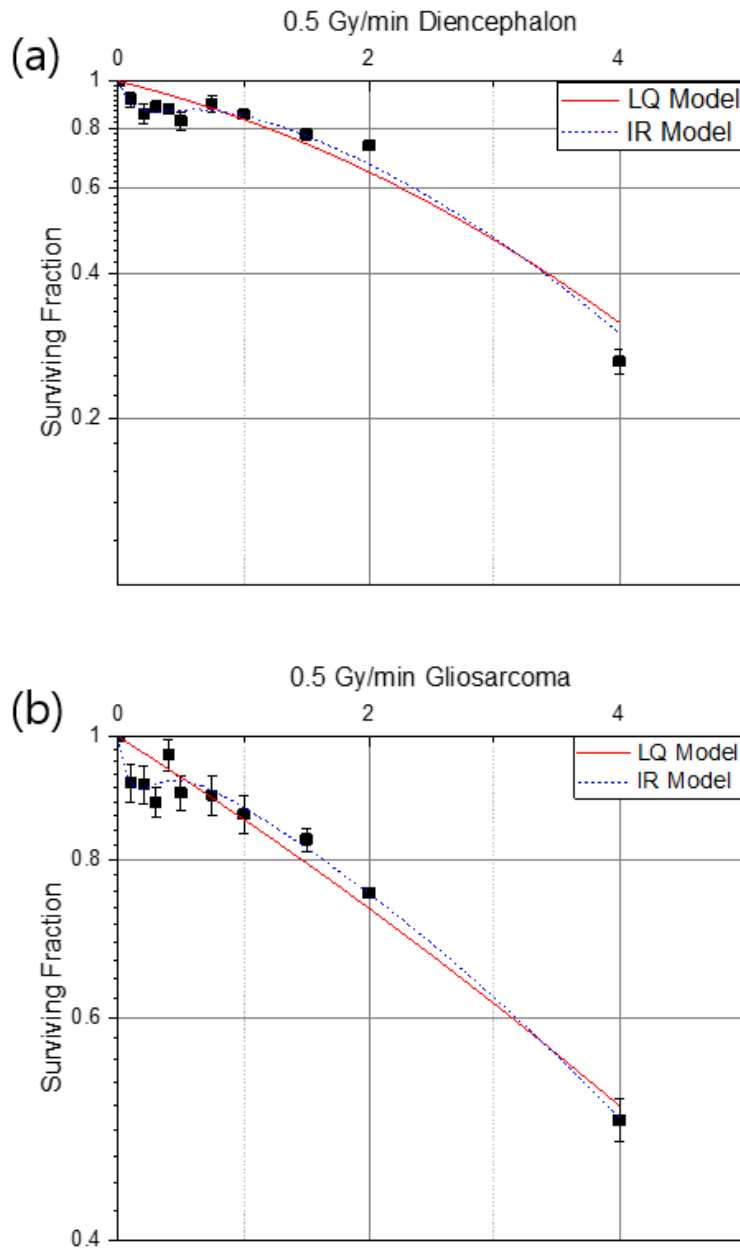


Fig. 4. 1. 2 Fitting results of clonogenic cell survival curves in rat diencephalon(a) and rat gliosarcoma(b) after 0.5 Gy/min dose rate x ray irradiation. Solid lines indicate the fitting results with LQ model and dashed lines for IR model.

Table 4. 1. 1 Parameters obtained from linear-quadratic model fitting with clonogenic survival curves after 0.5 Gy/min dose rate x-ray irradiation. The values in parentheses indicate standard error of each parameters.

세포 종류	선량률 (Gy/min)	α	β	R-Square
Rat Diencephalon	0.5	0.145 (0.058)	0.034 (0.023)	0.86044
Rat Gliosarcoma	0.5	0.144 (0.031)	0.006 (0.010)	0.89929

Table 4. 1. 2 Parameters obtained from induced-repair model fitting with clonogenic survival curves after 0.5 Gy/min dose rate x-ray irradiation. The values in parentheses indicate standard error of each parameters.

세포 종류	선량률 (Gy/min)	α_r	α_s	d_c	β	R-Square
Rat Diencephalon	0.5	0.0945 (0.041)	1.496 (0.587)	0.227 (0.075)	0.052 (0.016)	0.96515
Rat Gliosarcoma	0.5	0.112 (0.019)	1.616 (0.689)	0.138 (0.040)	0.015 (0.006)	0.97185

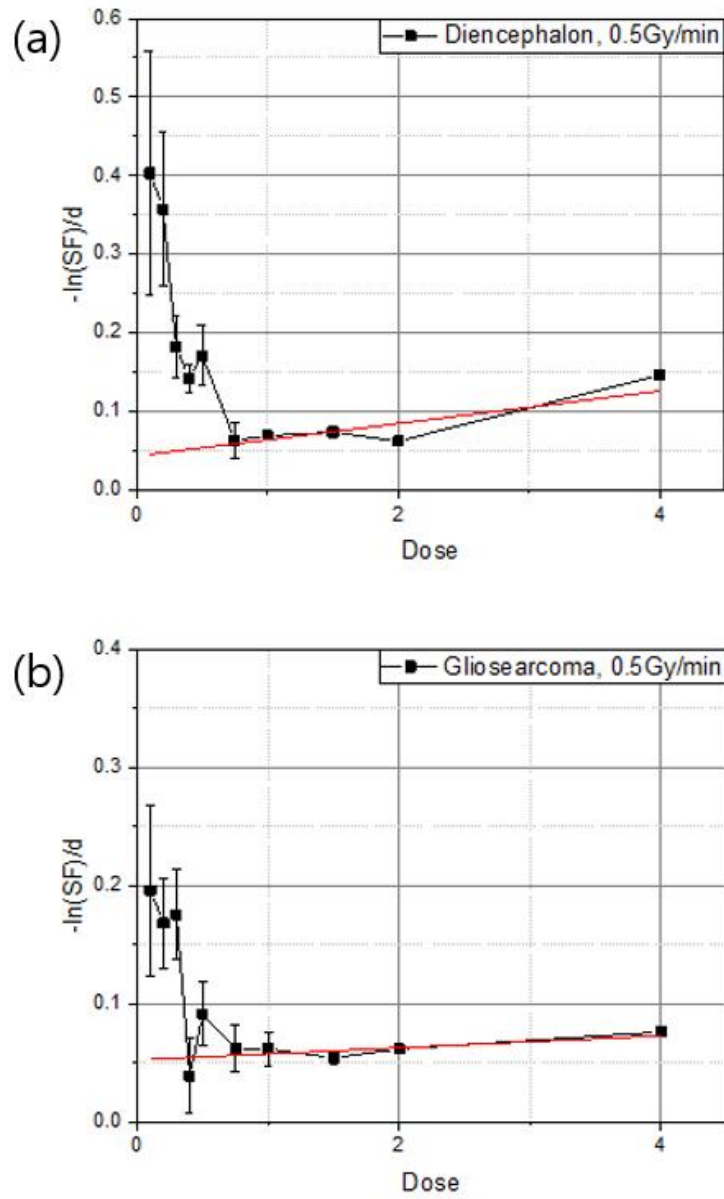


Fig. 4. 1. 3 Plotting results of $-(\ln(SF))/D$ as a function of D for rat diencephalon(a) and rat gliosarcoma(b) from survival fraction after 0.5 Gy/min dose rate X-ray irradiation. The error bars mean standard error of each data point. The solid lines represent the linear fitting results extrapolated with high dose range data.

4.2 방사선 선량률에 따른 HRS 현상의 변화

Rat diencephalon cell과 rat gliosarcoma cell을 대상으로 0.5 Gy/min의 선량률로 세포 군집형성능 실험을 수행했을 때 HRS 현상을 확인하였다. HRS 현상이 선량률을 다르게 하였을 때도 같은 결과를 나타내는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 방사선 선량률은 0.5 Gy/min보다 낮은 선량률인 0.125 Gy/min과 높은 선량률인 1.5 Gy/min을 선택하여 같은 실험을 진행하였다. 실험을 통해 얻은 생존율 곡선은 Fig. 4. 2. 1과 같다. 0.125 Gy/min의 선량률로 실험했을 경우 두 세포 모두 0.5 Gy/min의 선량률로 실험했을 때와의 생존율 곡선과 큰 차이가 없었다. 그러나 1.5 Gy/min의 선량률로 실험했을 경우 저선량 영역에서 HRS 현상이 일어나지 않았다. (Fig. 4. 2. 1)

4.1 절에서와 마찬가지로 HRS 현상의 유무를 판별하기 위해 각각의 생존율 곡선을 LQ 모델과 IR 모델로 fitting해봤다. (Fig. 4. 2. 2) 그 결과 R-square 값을 비교해봤을 때 두 세포 모두 0.125 Gy/min의 선량률에서는 0.5 Gy/min의 경우와 마찬가지로 IR 모델이 더 나은 fitting을 제공하였으나, 1.5 Gy/min의 선량률에서는 두 모델간의 차이가 없었다. 이를 통하여 0.5 Gy/min 이하의 선량률에서는 HRS 현상이 일어났으나, 1.5 Gy/min의 선량률에서는 HRS 현상이 일어났다고 해석하기 힘들다고 판단하였다. (Table 4. 2. 1과 4. 2. 2 참고)

또한 4.1에서 다룬 내용과 마찬가지로 각 선량률에서의 생존율 데이터를 이용하여 방사선 선량에 따른 $-\ln(SF)/d$ 값을 그래프로 그려보았다. 그 결과 두 세포 모두 Fig. 4. 2. 3에서 볼 수 있듯이 0.125 Gy/min의 선량률에 대해서는 함수의 개형이 선형성을 띄지 않았으나, 1.5 Gy/min의 선량률에서는 선형성을 띄는 것을 확인하였다.

HRS 현상은 저선량 방사선 피폭이 회복기작을 일으키지 못해 일어난다는 사실을 미루어 보았을 때 다음과 같은 해석을 제시할 수 있다. 저선량을 저선량 피폭은 세포 내 회복기작을 일으키지 못해 HRS 현상이 나타난 반면, 고선량의 경우 저선량의 방사선일지라도 회복 기작이 일어나 HRS 현상이 일어나지 않았을 것이라 예측가능하다. 이러한 해석을 검증하기 위해 2단계 방사선 조사 실험을 진행하였다.

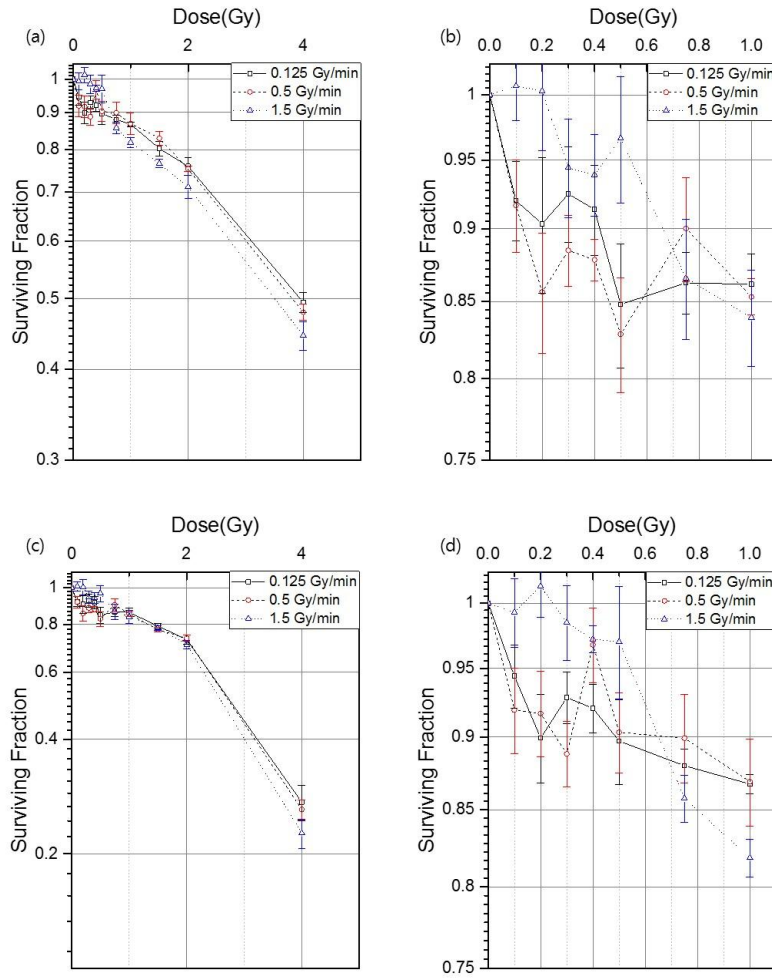


Fig. 4. 2. 1 Clonogenic cell survival curves in rat diencephalon(a, b) and rat gliosarcoma(c, d) after various dose rates x ray irradiation. The error bars mean standard error of each data point. (c) and (d) are the expanded graphs ranging 0 to 1 Gy.

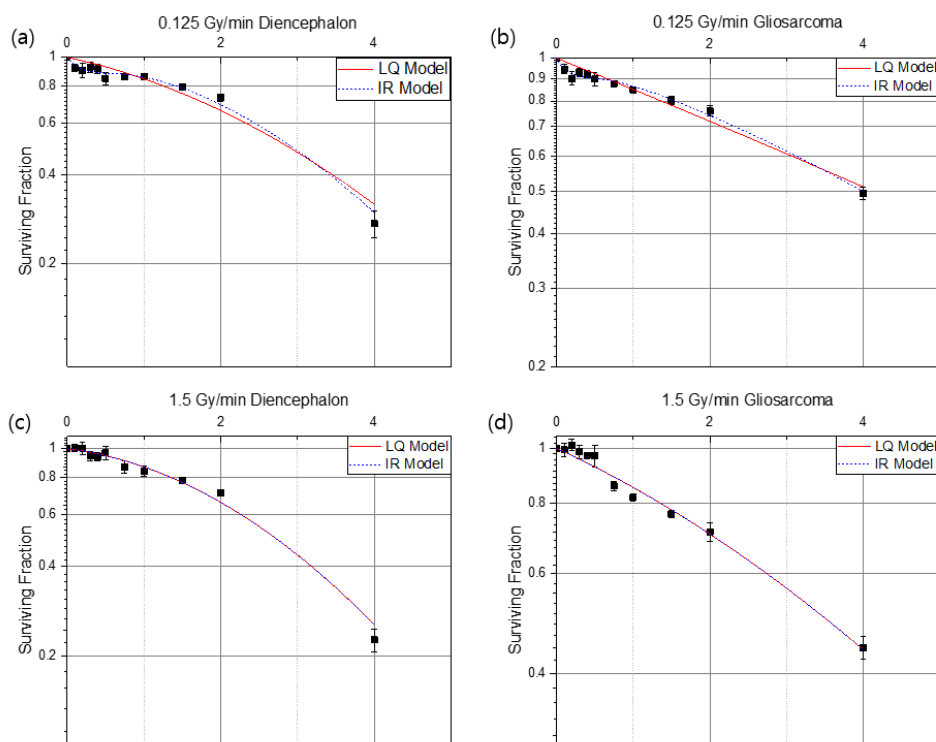


Fig. 4. 2. 2 Fitting results of clonogenic cell survival curves in rat diencephalon(a, c) and rat gliosarcoma(b, d) after 0.125 or 1.5 Gy/min dose rate x ray irradiation. Solid lines indicate the fitting results with LQ model and dashed lines for IR model.

Table 4. 2. 1 Parameters obtained from linear-quadratic model fitting with clonogenic survival curves after various dose rate x-ray irradiation. The values in parentheses indicate standard error of each parameters.

세포 종류	선량률 (Gy/min)	α	β	R-Square
Rat Diencephalon	0.125	0.129 (0.043)	0.039 (0.018)	0.92075
	0.5	0.145 (0.058)	0.034 (0.023)	0.86044
	1.5	0.075 (0.025)	0.067 (0.011)	0.98135
Rat Gliosarcoma	0.125	0.161 (0.024)	0.002 (0.008)	0.93876
	0.5	0.144 (0.031)	0.006 (0.010)	0.89929
	1.5	0.144 (0.022)	0.015 (0.008)	0.97128

Table 4. 2. 2 Parameters obtained from induced-repair model fitting with clonogenic survival curves after various dose rate x-ray irradiation. The values in parentheses indicate standard error of each parameters.

세포 종류	선량률 (Gy/min)	α_r	α_s	d_c	β	R-Square
Rat Diencephalon	0.125	0.114 (0.046)	0.937 (0.562)	0.245 (0.136)	0.046 (0.017)	0.96018
	0.5	0.0945 (0.041)	1.496 (0.587)	0.227 (0.075)	0.052 (0.016)	0.96515
	1.5	0.075 (0.029)	0	1.25E-08 (0)	0.067 (0.013)	0.97602
Rat Gliosarcoma	0.125	0.124 (0.016)	0.788 (0.233)	0.235 (0.064)	0.013 (0.005)	0.98651
	0.5	0.112 (0.019)	1.616 (0.689)	0.138 (0.040)	0.015 (0.006)	0.97185
	1.5	0.144 (0.022)	2.08E-29 (0)	1.33E-08 (0)	0.015 (0.009)	0.96308

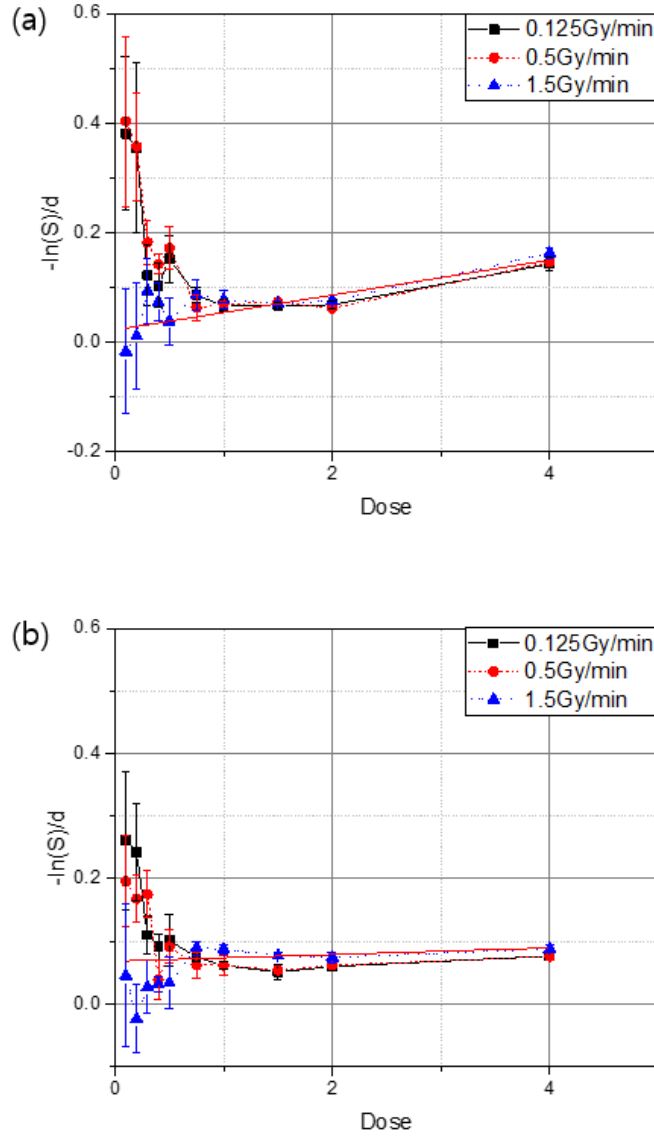


Fig. 4. 2. 3 Plotting results of $-(\ln(SF))/D$ as a function of D for rat diencephalon(a) and rat gliosarcoma(b) from survival fraction after various dose rates X-ray irradiation. The error bars mean standard error of each data point. The solid lines represent the linear fitting of data with 1.5 Gy/min dose rate.

4.3 2단계 조사(2-step irradiation) 실험

앞선 실험을 통하여 고선량률의 방사선은 저선량 영역에서 HRS 현상을 일으키지 않았던 반면, 저선량률의 방사선은 HRS 현상을 일으키는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 저선량 영역에서 저선량률의 방사선은 세포 내 회복기작을 작동시키지 못했던 반면 고선량률의 방사선은 회복기작이 작동해 세포의 생존율이 증가해 나타난 현상이라고 예상하였다. 이러한 가정을 입증하기 위해 2단계 조사 실험을 진행하였다. 1.5 Gy/min의 선량률은 0.2 Gy의 선량에서 HRS 현상을 보이지 않았기 때문에 회복 기작이 발현했다고 판단하였다. 따라서 1.5 Gy/min의 선량률로 0.2 Gy의 선량만큼 세포에 선행조사(Priming irradiation)한 후, 저선량률로 후행조사(Challenging irradiation)하여 세포군집형성능 실험을 진행하였다. 그 때의 실험 결과는 Fig. 4. 3과 같다. 두 세포 모두 선행조사를 하지 않았을 때와 비교하여 선행조사를 하였을 경우 저선량 영역에서 생존율이 증가하였고 HRS 현상이 없어졌다. 이를 통하여 1.5 Gy/min 선량률의 저선량 선행조사가 HRS 현상을 제거하였고 그 이유는 선행조사가 회복기작을 발현시켜 이후의 저선량률 피폭 시에 방사선에 대한 저항력이 생겨 HRS 현상이 일어나지 않은 것으로 해석된다. 이러한 결과는 앞서 저선량률 방사선 피폭은 HRS 현상을 일으키는 반면 고선량률 방사선 피폭은 그렇지 않은 이유를 설명해줄 수 있다.

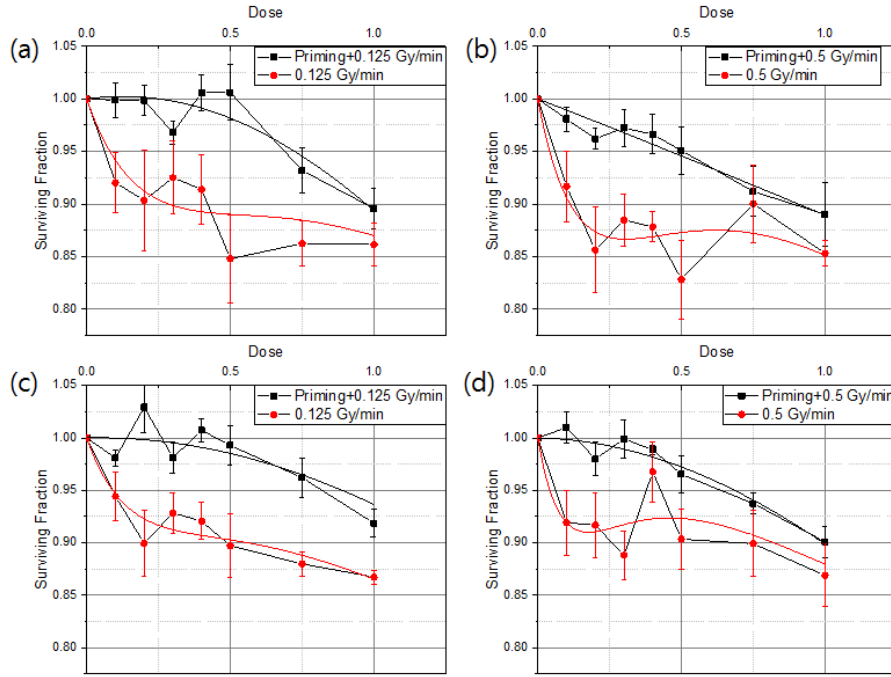


Fig. 4. 3 Clonogenic survival curve of cells irradiated with single doses of various dose rates of X-ray or irradiated with a 0.2 Gy priming dose of 1.5 Gy/min dose rate before the challenge doses shown on the dose axis were given with 0.125 or 0.5 Gy/min dose rates. (a) and (b) for rat diencephalon and (c) and (d) for rat gliosarcoma. The error bars mean standard error of each data point.

4.4 Apoptosis 분석 결과

저선량 영역에서 생존율이 떨어져 HRS 현상이 일어나는 원인이 세포 자살(apoptosis)에 의해 나타나는 것임이 확인되었다. [5] 저선량 방사선에 의해서는 회복 기작이 일어나지 않고, 이로 인해 있을 세포의 유전적 변형을 방지하기 위해 apoptosis가 일어나는 것이다. 본 연구에서는 선량률이 HRS 현상의 유무에 영향을 끼칠 수 있다고 판단하였고, 이러한 결과가 선량률에 따른 apoptosis의 유발의 차이와 관련성이 있다고 예측하였다. 이에 apoptosis를 정량적으로 측정할 수 있는 Annexin V 실험을 계획하였다. 저선량 방사선에 대하여 선량률을 0.125, 0.5 그리고 1.5 Gy/min으로 설정하여 방사선 선량에 따른 apoptosis가 일어나는 정도를 분석하였다. Fig. 4. 4는 각 선량에서의 apoptosis 유발 정도를 0 Gy에서의 값으로 정규화한 것을 나타낸다. 앞선 실험결과를 통해 0.125와 0.5 Gy/min의 선량률에서는 HRS 현상이 나타나지 않은 것을 확인했다. Apoptosis의 정도를 살펴보면 저선량(0.2 Gy)에서 0.125와 0.5 Gy/min 선량률로 세포를 피폭 시킬 경우 상당한 비율만큼 apoptosis가 일어났음을 확인하였다. 반면 1.5 Gy/min의 선량률로 0.2 Gy만큼 피폭시킬 경우 apoptosis가 일어난 비율이 0 Gy에서와 비교하였을 때 큰 차이가 없는 것으로 확인하였다. 이를 통해 HRS 현상이 apoptosis에 의한 세포사멸로 인한 것으로 유추할 수 있다. 또한 이러한 결과를 통해 선량률에 따라 회복 기작이 다르게 나타날 것을 예상할 수 있다. 0.125와 0.5 Gy/min의 선량률로 저선량 피폭을 일으킬 경우 회복 기작이 일어나지 않아 이에 대한 반응으로 apoptosis가 일어난 것으로 해석할 수 있다. 반면 1.5 Gy/min의 선량률은 저선량 피폭 시에도 회복 기작이 일어나 apoptosis가 일어나지 않은 것이다. 본 실험 결과를 통해 HRS 현상이

apoptosis와 관련이 있다는 사실을 확인하여 선행 연구와의 일관성을 확인하였다. 또한 선량률이 달라짐에 따라 저선량 영역에서 apoptosis가 차이를 갖고 나타남을 확인함으로써 선량률이 HRS 현상에 어떤 영향을 끼치는지 분석할 수 있다.

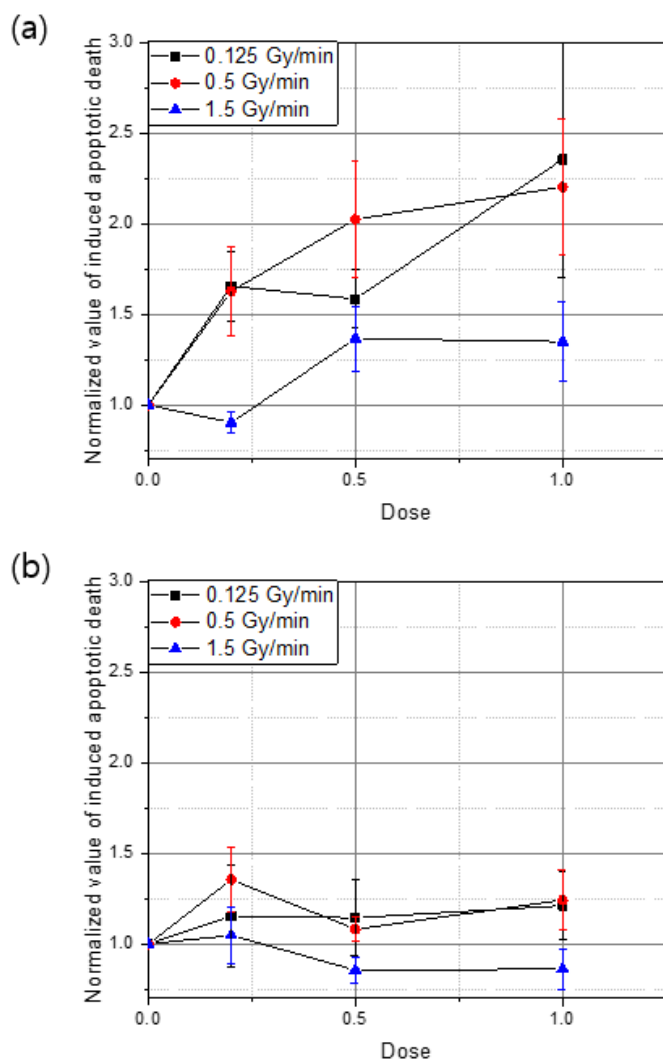


Fig. 4. 4 Normalized value of induced apoptotic death in rat diencephalon (a) and rat gliosarcoma(b) after X-ray irradiation with various dose rates. The error bars mean standard error of each data point.

4.5 논의

4.5.1 선행연구와의 차이점 분석

위의 결과 분석을 통하여 고선량률의 방사선 피폭은 HRS 현상을 일으키지 않는다는 사실을 유추할 수 있는데, 이는 기존의 선행 연구들에서 나타난 결과와 상이하다. Marples et al.는 V79 Chinese hamster 세포를 대상으로 0.016 Gy/min, 0.44 Gy/min 그리고 1.7 Gy/min으로 선량률을 변화시켜가며 세포 군집형성능 실험을 진행한 결과 선량률 조건이 달라져도 HRS 현상의 여부에는 큰 상관이 없다고 밝혔다. [3] HRS 현상이 일어나는 선량 범위, 그 때의 생존율 모두 차이가 없었다. 이러한 결과가 나온 이유는 선량률이 바뀔에 따라 다른 생존율을 나타낼 수 있는 경우는 세포 내 회복 기작이 원만하게 일어날 수 있을 때에만 있을 수 있기 때문이라고 언급하였다. 즉, 저선량 영역에서는 세포 회복 기작이 없을 것으로 추정되기 때문에 선량률의 변화가 HRS 현상에 큰 영향을 끼치지 않는다고 주장하였다. 위 연구는 HRS 현상이 일어나는 메커니즘이 알려지기 전에 이루어졌는데, 위와 같은 논리는 HRS 현상이 저선량 영역에서 회복기작의 부재로 인한 것이라는 사실과 일치한다. 그러나 위 연구에서는 저선량 영역이라도 선량률이 높아진다면 회복 기작이 일어날 수 있음을 간과하였다.

Thomas et al.는 Rat colon carcinoma 세포를 이용하여 0.0025 ~ 0.23 Gy/min의 선량률로 세포 군집형성능 실험을 진행하였다. [6] 그 결과 Marples의 결과와 마찬가지로 모든 선량률에서 HRS 현상이 나타났다. 그러나 Marples의 결과와는 달리 선량률을 다르게 하면 HRS 현상이 나타나는 방사선 선량의 범위가 달랐다. 특히 이 범위는 선량률과 비례하

게 나타났는데 이것이 의미하는 바는 HRS 현상이 일어나는 범위는 선량률과 관계없이 일정한 시간 동안의 방사선 피폭 하에 일어난다는 것이다. Thomas는 약 20초의 방사선 피폭은 방사선 선량률과 관계없이 HRS 현상을 일으킨다고 주장하였다. 그 원인은 20초 이내의 방사선 피폭은 세포가 DSB를 인지하기에 너무 짧은 시간이고 이로 인해 DNA 손상이 회복되지 못해 결국에는 세포의 죽음으로 이른다는 것이다. 하지만 이러한 논지는 다른 선행연구와 상반된다. Wykes는 HRS 현상이 일어나는 세포와 일어나지 않는 세포 사이에서의 DSB를 정량적으로 측정했다. [17] 그러나 두 세포 군 사이에 DSB 인지능력 차이나 DNA 손상 정도의 차이를 발견하지 못했고 이를 통하여 HRS 현상과 DSB 인지능력은 관계가 없다고 밝혔다. 따라서 Thomas의 연구 결과가 모든 포유류계 세포에서 일관성 있게 나타나는 현상인지 확인해 볼 필요가 있다고 판단하였다.

본 연구에서는 rat diencephalon과 rat gliosarcoma를 대상으로 HRS 현상에 대해 연구하였다. Fig 4. 2. 1에서 볼 수 있듯이, 0.125 Gy/min과 0.5 Gy/min 조건 하에는 약 0.2 Gy 선량 미만의 방사선에서 생존율이 낮게 나타났다. 다시 선량이 0.4 Gy 이상의 수준으로 증가하게 되면 생존율이 LQ 모델로 예상했을 때의 수준으로 회복된다. 반면, 1.5 Gy/min의 선량률에서는 생존율이 낮게 나타나는 구간이 나타나지 않았고 이에 따라 필연적으로 생존율이 회복되는 구간 역시 나타나지 않았다. 이러한 결과는 저선량률 피폭 시에는 0.2 Gy의 수준의 방사선은 세포 내 회복 기작이 나타나지 않아 생존율이 떨어져 HRS 현상이 일어나게 되고, 선량이 0.4 Gy 수준으로 높아지게 되면 회복 기작이 나타나 생존율이 정상적인 수준(LQ 모델로 예상 가능한 수준)으로 회복되는 것을 의미한다. 반면 고선량률 피폭 시에는 모든 선량 내에서 회복 기작이 나타나

HRS 현상이 일어나지 않는다고 해석하였다. 이런 현상이 일어나는 원인을 방사선 선량률에 따라 세포 내에서의 손상 회복 기작이 다르게 일어나기 때문이라고 예측하였다. 같은 저선량의 방사선이라도 고선량률의 방사선에 의해 피폭이 되면 단위 시간당 DNA 손상의 양이 더 크기 때문에 더 쉽게 피해를 인지할 수 있을 것이기 때문이다. 따라서 저선량의 방사선일지라도 고선량률의 피폭은 세포에 더 많은 피해를 야기할 수 있고 이로 인해 쉽게 회복 기작이 작용할 수 있음을 예상할 수 있다. 한 선행 연구에 따르면 방사선 선량률에 따라 DNA 회복 기작에 관여하는 ATM의 활성화 정도가 다르다는 것이 알려졌다. [18] 방사선 선량률이 낮으면 ATM이 활성화가 잘 일어나지 않아 저선량률의 방사선이 더 큰 피해를 입힐 수 있다. 선량률에 따른 ATM 활성화의 여부는 선량률에 따라 HRS 현상이 다르게 일어나는 것을 설명할 수 있다.

본 연구를 통해 HRS 현상이 보이지 않기 시작하는 방사선 선량률의 문턱값(Threshold)이 존재한다고 가정할 수 있다. 세포마다 방사선에 대한 민감성이 다르듯이 이 문턱값도 세포마다 다를 것이다. 이 문턱값 이상의 선량률은 저선량의 방사선 피폭에서도 세포 회복기작을 일으켜 HRS 현상이 보이지 않는 반면, 그 이하의 선량률은 HRS 현상을 일으킨다. Rat diencephalon과 rat gliosarcoma의 방사선 선량률 문턱값은 0.5 Gy/min과 1.5 Gy/min사이의 값을 가질 것을 예측할 수 있다. 또한 이러한 가정을 통해 선행연구들을 재해석 할 수 있다. 우선 Marples의 연구에서는 V79 Chinese Hamster 세포에서 HRS 현상이 방사선 선량률과 관계없이 항상 일어난다는 결과를 보였지만, 실험에 사용한 선량률이 해당 연구에서 사용한 세포의 선량률 문턱값보다 낮은 것이었을 가능성이 있다. [3] 이 연구에서 사용한 가장 고선량률은 1.7 Gy/min이었는데, 문턱값이 이 이상의 값이기 때문에 HRS 현상이 항상 나타나는 것처럼 보

였을 수 있다. 또한, 위에서 언급했듯이 3.7, U373, SiHa 등의 세포에서는 HRS 현상이 일어나지 않았는데 해당 실험에서 사용한 방사선 선량을 조건을 각 세포들의 문턱값 이상으로 설정하였기 때문에 HRS 현상이 일어나지 않았을 가능성이 있다. [8, 9, 19] 따라서 해당 세포들에서 HRS 현상에 있어서 방사선 선량을 문턱값을 갖고 있는지 확인해 볼 필요가 있다.

4.5.2 방사선 방호의 관점에서 본 연구가 가지는 의의

본 연구를 통해 정상세포와 종양세포를 막론하고 일정 값 이하의 선량률에 의해 HRS 현상이 일어남을 확인할 수 있었다. BEIR VII report와 ICRP에 따르면 저선량 방사선을 100 mSv미만의 방사선으로 정의하고 있다. [20, 21] 이 구간의 선량률에서는 HRS 현상이 일어날 수 있다. 이를 통해 HRS 현상을 저선량 방사선의 위해성을 대변하는 것이라 해석하고 기존에 알려진 것보다 위해성을 과대평가를 할 여지가 있다. 그러나 선행연구 뿐만 아니라 본 연구에서 HRS 현상이 apoptosis에 의한 것으로 나타났다. Apoptosis를 통하여 충분히 회복되지 못한 세포를 제거함으로써 정상세포를 종양화로부터 지킬 수 있다. 즉, HRS 현상은 저선량 방사선에 대한 세포의 민감성을 대표하는 현상이 아니라 개체의 건전성을 지키기 위해 일어나는 것이다. 실제로 BEIR VII report에서 HRS 현상을 통해 저선량 방사선 피폭에 대한 위해성을 과대평가 할 여지가 없다고 밝혔다. 이를 통해 HRS 현상을 저선량 방사선에 대한 방어기작으로 작용한다고 해석하는 것이 옳다고 판단된다.

4.5.3 방사선 치료의 관점에서 본 연구가 가지는 의의

방사선을 이용한 암 치료 시에, 종양 세포에는 고선량의 피폭을 유도하면서 정상세포의 피폭 선량은 최소화하기 위해 분할조사를 하는 치료 기법이 이용하고 있다. [22] 실제 통상적인 분할 조사 시에 종양세포에 일주일동안 2 Gy씩 5번 조사하는 전략을 이용하고 있다. 그러나 정상세포에는 훨씬 낮은 선량의 방사선이 피폭될 것이고 이때의 피폭 선량이 HRS 현상이 일어나는 선량인 약 0.2 Gy 수준일 가능성이 높다. 이 때문에 분할조사 치료 시에 정상세포의 사멸이 예상보다 커질 우려가 있다. 본 연구를 통하여 고선량률의 저선량 피폭은 HRS 현상을 회피할 수 있음을 확인하였으므로, 고선량률의 치료가 진행된다면 종양세포에는 비슷한 치료효과를 내면서 정상세포를 보호할 수 있다. 따라서 방사선 분할조사 치료 계획 시에 선량률의 신중한 선택이 요구됨을 제시 할 수 있다.

더 나아가 HRS 현상을 이용하여 종양세포의 효율적인 제거를 목표로 하는 치료 기법이 연구 중에 있다. HRS 현상을 이용한 치료 기법의 기본적인 전략은 HRS 현상이 일어날 것으로 예상되는 저선량의 방사선으로 분할 조사함으로써 단일 조사보다 더 높은 cell killing 효과를 보고자 하는 것이다. P. M. Spring et al.은 이와 같은 저선량 분할조사와 항암제인 taxane과 동시 처리 했을 때 단일조사와 taxane를 동시 처리하였을 경우보다 암세포의 사멸효과가 더 컸음을 확인하였다. [23] 반면 D. Schoengerr et al.과 M. Krause et al의 연구에서는 HRS 현상을 이용한 저선량 분할 조사가 단일조사와 비교했을 때 큰 차이가 없음을 보였다. [24, 25] 이와 같이 HRS 현상을 이용한 치료 기법의 효용성에 대해서는 일관성 있는 연구 결과가 나타나지 않았다. 그러나 본 연구를 통하여 선

량률에 따라서 HRS 현상의 유무가 달라질 수 있으므로 HRS 현상을 이용한 치료 기법 연구 시에 선량률의 선택이 연구 결과에 영향을 끼칠 수 있다고 제시하는 바이다.

제 5 장 결론

저선량 방사선의 위해성에 대한 연구는 다양한 방식으로 연구되고 있지만 명확한 결론이 나지 않았다. 본 연구 역시 저선량 방사선에 대한 연구로 정상세포와 종양세포에서의 HRS(Hyper-radiosensitivity) 현상을 주제로 하였다. 특히 HRS 현상과 방사선 선량률의 관계성에 대해서는 일관성 있는 결론이 나지 않아 이에 대한 추가적인 연구가 필요한 실정이었다. 따라서 본 연구에서는 HRS 현상과 방사선 선량률과의 관계성을 중점적으로 연구했다.

0.5 Gy/min의 선량률로 rat diencephalon과 rat gliosarcoma를 피폭시켜 세포 군집형성능 실험을 진행한 결과 HRS 현상이 일어남을 확인하였다. 이를 통하여 HRS 현상이 정상세포와 종양세포 모두에서 일어나는 것임을 확인하였다. 방사선 선량률이 HRS 현상에 끼치는 영향성을 확인하기 위해 선량률을 0.125와 1.5 Gy/min으로 하여 같은 실험을 진행하였다. 0.125와 0.5 Gy/min의 선량률에서는 HRS 현상을 확인하였으나 1.5 Gy/min의 선량률에서는 명확한 HRS 현상을 발견하지 못하였다. HRS 현상이 세포 내 회복 기작의 부재로 일어난다는 점에서 선량률에 따른 HRS 현상의 유무가 회복 기작의 차이로 인해 나타난다는 것을 유추할 수 있다. 1.5 Gy/min의 고선량률로 피폭 시에 같은 0.2 Gy의 저선량이라도 저선량률 피폭 시와는 다르게 회복 기작이 일어난다는 가설을 검증하기 위해 2단계 조사 실험을 진행하였다. 1.5 Gy/min의 선량률로 0.2 Gy의 선량만큼 선행조사한 후 0.125와 0.5 Gy/min의 저선량률로 피폭시킨 결과 앞선 결과와 다르게 HRS 현상이 나타나지 않은 것을 확인하였다.

이 결과를 통해 1.5 Gy/min 선량률의 선행조사가 세포 내 회복 기작을 유도하였고 이로 인해 저선량률 피폭 시 HRS 현상이 일어나지 않은 것으로 해석하였다. 마지막으로 선량률에 따른 apoptosis의 유발 정도를 확인하였다. 그 결과 저선량 방사선(0.2 Gy)에서 고선량률 피폭 시에는 저선량률 피폭 시보다 apoptosis가 더 적게 일어난 것을 확인하였다. 이를 통해 고선량률 피폭 시에는 회복 기작이 일어나 apoptosis가 일어나지 않은 반면, 저선량률 피폭 시에는 충분한 회복이 일어나지 않아 apoptosis가 더 많이 일어난 것을 알 수 있었다. 위의 결과들을 분석하여 고선량률 피폭 시에는 회복 기작이 일어나 HRS 현상이 일어나지 않은 것을 확인하였다.

본 연구를 통하여 Marples와 Thomas의 선행연구와는 다르게 선량률이 높아지면 HRS 현상이 일어나지 않음을 알 수 있다. [3, 6] 또한 HRS 현상이 일어나는 주요 기전이 apoptosis임을 확인하였고, 이를 토대로 HRS 현상이 저선량 피폭의 risk를 대변하는 현상이 아닌 개체의 건전성을 유지하기 위해 나타나는 현상이라고 해석할 수 있다. 마지막으로 암 치료를 위한 방사선 분할 치료 시에 정상세포의 사멸을 방지하기 위해 HRS 현상을 회피할 수 있는 선량률을 선택할 필요성이 있다.

본 연구는 in vitro의 방식으로 HRS 현상에 대해 연구했다. 선량률과 HRS 현상 간의 관계성에 대해 명확하게 규명하기 위해서는 다른 세포 재에 대해서도 연구를 진행해야 할 것이며 본 연구에서 다루지 못한 세포 회복 기작에 관여하는 단백질 분석 연구도 진행되어야 할 것이다. 또한 in vivo 실험을 통한 추후 연구도 진행되어야 한다.

참 고 문 헌

- [1] T. T. Puck and P. I Marcus, Action of X-rays on mammalian cells, *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 103, No. 5, pp. 653-666, 1956.
- [2] R. E. Durand, Use of a cell sorter for assays of cell clonogenicity, *Cancer Research*, Vol. 46, No. 6, pp. 2775-2778, 1986.
- [3] B. Marples and M. C. Joiner, The response of chinese hamster V79 cells to low radiation doses: Evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population, *Radiat. Res.*, Vol. 133, No. 1, pp. 41-51, 1993.
- [4] S. A. Krueger, S. J. Collis, M. C. Joiner, G. D. Wilson and B. Marples, Transition in survival from low-dose hyper-radiosensitivity to increased radioresistance is independent of activation of ATM SER1981 activity, *Int. J. Radiat. Oncology Biology Physics*, Vol. 69, No. 4, pp. 1262-1271, 2007.
- [5] S. A. Krueger, M. C. Joiner, M. Weinfeld, E. Piasentin and B. Marples, Role of apoptosis in low-dose hyper-radiosensitivity, *Radiat. Res.*, Vol. 167, No. 3, pp. 260-267, 2007.
- [6] C. Thomas, J. Martin, C. Devic, E. B. Krisch, M. Diserbo and J. Thariat, Impact of dose-rate on the low-dose hyper-radiosensitivity and induced radioresistance(HRS/IRR) response, *Radiat. Res.*, Vol. 89, No. 10, pp. 813-822, 2013.

- [7] E. L. Alpel, "Radiation biophysics", Academic press, pp. 111-41, 1998.
- [8] B. G. Wouters, A. M. Sy and L. D. Skarsgard, Low-dose hypersensitivity and increased radioresistance in a panel of human tumor cell lines with different radiosensitivity, *Radiat. Res.*, Vol. 146, No. 4, pp. 399-413, 1996.
- [9] S. C. Short, M. Woodcock, B. Marples and M. C. Joiner, Effects of cell cycle phase on low-dose hyper-radiosensitivity, *Int. J. Radiation Biology*, Vol. 79, No. 2, pp. 99-105, 2003.
- [10] B. Marples, G. K. Y. Lam, H. Zhou and K. A. Skov, The response of Chinese hamster V79-379A cells exposed to negative pi-mesons: Evidence that increased radioresistance is dependent on linear energy transfer. *Radiat. Res.*, Vol. 138, No.1s, pp. 81-84, 1994.
- [11] G. Schettino, M. Folkard, K. M. Prise, B. Vojnovic, A. G. Bowey and B. D. Michael, Low-dose hypersensitivity in Chinese hamster V79 cells targeted with counted protons using a charged-particle microbeam, *Radiat. Res.*, Vol. 156, No. 5, pp. 526-534, 2001.
- [12] C. Dionet, A. Tchirkov, J. P. Alard, J. Arnold, J. Dhermain, M. Rapp, V. Bodez, J. C. Tamain, I. Monbel, P. Malet, F. Kwiatkowski, D. Donnarieix, A. Veyre and P. Verrelle, Effects of low-dose neutrons applied at reduced dose rate on human melanoma cells, *Radiat. Res.*, Vol. 154, No. 4, pp. 406-444, 2000.

- [13] E. Tsoulou, L. Baggio, R. Cherubini and C. A. Kalfas, Radiosensitivity of V79 cells after alpha particle radiation at low doses, *Radiation Protection Dosimetry*, Vol. 99, No. 1-4, pp. 237-240, 2002.
- [14] M. C. Joiner and H. Johns, Renal damage in the mouse: the response to very small doses per fraction, *Radiat. Res.*, Vol. 114, No. 2, pp. 385-398, 1988.
- [15] S. Hermann, Mechanisms and genes of cellular suicide, *Science*, Vol. 267, No. 5203, pp. 1445-1449, 1995.
- [16] A. J. Levine, p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell*, Vol. 88, No. 3, pp. 321-31, 1997.
- [17] S. M. Wykes, E. Piasentin, M. C. Joiner, G. D. Wilson and B. Marples, Low-dose hyper-radiosensitivity is not caused by a failure to recognize DNA double-strand breaks. *Radiat. Res.*, Vol. 165, No. 5, pp. 516-524, 2006.
- [18] H. Nakamura, Y. Yasui, N. Saito, A. Tachibana, K. Komatsu and K. Ishizaki, DNA repair defect in AT cells and their hypersensitivity to low-dose-rate radiation, *Radiat. Res.*, Vol. 165, No. 3, pp. 277-282, 2006.
- [19] S. A. Krueger, G. D. Wilson, E. Piasentin, M. C. Joiner and B. Marples, The effects of G2-phase enrichment and checkpoint abrogation on low-dose hyper-radiosensitivity, *Int. J. Radiat. Oncology Biol. Phys.*, Vol. 77, No. 5, pp. 1509-1517, 2010.

- [20] BEIR VII. Health risks from exposure to low levels of ionizing radiation, National Research Council of the National Academies, Washington D. C., 2006.
- [21] ICRP, low-dose extrapolation of radiation related cancer risk. Publication 99, Annals of the ICRP, Vol. 35, Elsevier, Amsterdam, 2006.
- [22] B. S. Teh, S. Y. Woo and E. B. Butler, Intensity modulated radiation therapy(IMRT): a nes promising technology in radiation oncology, The Oncologist, Vol. 4, No. 6, pp. 433-442, 1999.
- [23] P. M. Spring, S. M. Arnold, S. Shajahan, B. Brown, S. Dey and S. M. Lele, Low dose fractionated radiation potentiates the effects of taxotere in nude mice xenografts of squamous cell carcinoma of head and neck, Cell Cycle, Vol. 3, No. 4, pp. 477-483, 2004.
- [24] D. Schoenherr, S. A. Krueger, L. Martin, L. Marignol, G. D. Wilson and B. Marples, Determining if low dose hyper-radiosensitivity(HRS) can be exploited to provide a therapeutic advantage: A cell line study in four glioblastoma multiforme(GBM) cell lines, Int. J. Radiation biology, Vol. 89, No. 12, pp. 1009-1016, 2013.
- [25] M. Krause, J. Prager, J. Wohlfarth, F. Hessel, D. Dorner, M. Haase, M. C. Joiner and M. Baumann, Ultrafractionation does not improve the results of radiotherapy in radioresistant murine DDL1 lymphoma, Strahlentherapie und Onkologie, Vol. 181, No. 8. pp. 540-544, 2005.

Abstract

The effect of X-ray dose rates on low-dose HRS phenomenon with cells *in vitro*

Kim Keon Min

Department of Nuclear Engineering

The Graduate School

Seoul National University

The researches about risk of low dose radiation is still going on. HRS phenomenon is studied actively as part of low dose radiation research. HRS is that mammalian cells exhibit higher sensitivity to radiation at low doses than expected by the linear-quadratic model when clonogenic assay is done. The mechanisms about HRS is verified well, but studies about the relationship between HRS and radiation dose rates have no consistency. Therefore, in this study, the effect of radiation dose rates on HRS is verified with *in vitro* experiments.

Clonogenic assay is conducted with rat diencephalon and rat gliosarcoma with 0.5 Gy/min dose rate condition and HRS was observed with this condition in both cell lines. The dose rate was

changed to 0.125 and 1.5 Gy/min. As a result, HRS was observed with 0.125 Gy/min radiation but not with 1.5 Gy/min in both cell lines. It is expected that the difference of repair mechanisms with different dose rates is the key point of above experiments results. To verify the assumption, the two-step irradiation clonogenic assay is done. After priming irradiation with 0.2 Gy, 1.5 Gy/min condition, the HRS phenomenon was eliminated when irradiated with 0.125 and 0.5 Gy/min dose rates in both cell lines. Through this result, it is analyzed that high dose rate irradiation can induce repair mechanisms even at low dose range. Lastly, induced apoptosis with different dose rates was observed with flow-cytometry experiment. With low dose rate conditions that HRS is seen, apoptosis was induced more than high dose rate condition in both cell lines. It is interpreted that when cells are irradiated with high dose rate low dose radiation the repair mechanisms were induced so apoptosis did not occur.

In this study, the different conclusion is made compared with preceding researches in relationship between HRS and radiation dose rates. And it is confirmed that apoptosis cell death is a important factor in HRS response, therefore there is little reason to overestimate the biological effect of low dose radiation exposure with HRS phenomenon. Finally, in the case of fractionated radiation therapy for cancer treatment, proper dose rate that can prevent HRS response could be selected to protect normal cells from unnecessary cell death.

keywords : HRS phenomenon, radiation dose rate, low dose radiation, apoptosis, radiation protection

Student Number : 2015-21309